ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 44, 4, 2010

УДК 576.895.42

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА САМОК ТАЕЖНОГО КЛЕЩА (IXODES PERSULCATUS: IXODIDAE) ПО ИЗМЕНЕНИЯМ ЗАПАСОВ ЖИРА В ОРГАНИЗМЕ

© Ю. С. Балашов, Л. А. Григорьева

Зоологический институт РАН
Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034
E-mail: tick@zin.ru

Поступила 07.06.2010

Разработана методика определения биологического возраста голодных самок по содержанию жировых включений в клетках средней кишки и жирового тела. Для оценки запасов жира живых клещей вскрывали, и фрагменты отпрепарированных внутренних органов прижизненно окрашивали в насыщенном растворе судана III в 70°-ном спирте. Выделены 3 возрастные группы: I — молодые самки, кишечник и жировое тело которых заполнены жировыми включениями; II — зрелые особи, жировые запасы которых частично израсходованы; III — старые самки, в кишечнике и жировом теле которых выявляются единичные жировые включения.

Ключевые слова: *Ixodes persuleatus*, самки, биологический возраст, жировые запасы, кишечник, жировое тело.

Демографический подход в исследованиях популяций переносчиков стал одной из главных составляющих современных достижений в контроле численности кровососущих членистоногих и передаваемых ими инфекций (Randolph, 2004; Балашов, 2009). К сожалению, работы в этих направлениях с иксодовыми клещами значительно отстают от исследований комаров и других двукрылых.

Раскрытие возрастного состава природных популяций иксодовых клещей возможно только при наличии адекватных методик определения календарного и биологического возраста этих членистоногих. Большинство демографических исследований касается треххозяинных видов рода *Ixodes* и в меньшей степени *Dermacentor*. На каждой фазе развития эти виды питаются однократно и дальнейшее их существование зависит от пищевых резервов, накопленных в этот период. Сроки жизни голодных особей в зависимости от внешних факторов и в первую очередь температуры и влажности варьируют от нескольких месяцев до 1 года и более (Таежный.., 1985). За это время голодающие клещи должны найти нового хозяина или погибнуть от истощения. Календарный возраст имаго клеща соответствует времени его жизни после линьки из нимфы, а биологический возраст —

степени израсходованности пищевых резервов и других необратимых изменений в организме, происходящих в послелиночный период.

В применении к иксодовым клещам часто вместо термина биологический возраст в качестве синонима используют более старый термин — «физиологический возраст». Физиологический возраст характеризует лишь одну из групп возрастных изменений в организме клеща. Термин «биологический возраст» представляется нам более точным, так как он объединяет всю совокупность возможных возрастных изменений в организме.

У таежного клеща *Ixodes persulcaus* с многолетним жизненным циклом особи одного биологического возраста могут принадлежать к разным возрастным когортам, а их календарный возраст может отличаться на несколько месяцев или даже лет (Балашов, 1998, 2010). Точная оценка календарного возраста отдельной особи затруднительна и экстраполируется по ее возможному биологическому возрасту и принадлежности к определенной возрастной когорте природной популяции.

Соответственно существующие оценки демографического состава популяций опираются на относительные оценки биологического возраста голодных клещей. С этой целью было разработано несколько методик определения биологического возраста голодающих особей. Первой была методика анатомо-гистологического определения возраста голодных клещей, которая позволила различать 4 последовательные стадии истощения (возраста) голодающих особей. Различия между возрастными группами основываются на степени заполнения отростков кишечника остатками крови, на количестве включений гемоглобина и гематина в пищеварительных клетках и на степени загрузки мальпигиевых сосудов гуанином. Описанный метод достаточно точен, но весьма трудоемок, так как требует использования гистологической техники (Балашов, 1961, 1962).

В дальнейшем описанная методика определения возраста была усовершенствована и значительно детализировала первоначальную схему Ю. С. Балашова (Разумова, 1977, 1982, 1987). Стали использоваться внешние признаки (полнота тела, цвет и плотность кутикулы, просматриваемость внутренних органов сквозь кутикулу) и анатомические детали (объем и окраска кишечника, состояние стенок мальпигиевых сосудов и ректального пузыря, развитие рыхлой соединительной ткани жирового тела). В пределах 4 основных физиологических возрастов голодных иксодовых клещей, соответствующих четырем степеням упитанности или истощенности (новорожденные, молодые, зрелые и старые), вводилось их дополнительное дробление (Репкина, 1985). Анатомо-гистологический метод определения возраста клещей получил широкое распространение и используется до настоящего времени (Uspensky, 1995). К сожалению, эта методика не позволяет оценить возраст живых особей и кроме того достаточно трудоемка.

Перспективными представляются оценки биологического возраста клещей по изменениям их внешнего облика и особенно состояния покровов туловища. У голодных особей расходование пищевых резервов и содержания воды в организме приводит к постепенному уплощению туловища (идиосомы), заметному даже невооруженным глазом. В процессе старения обнаруживаются изменения в соотношении размеров спинного щитка (скутума) и растяжимой поверхности идиосомы (аллоскутума) клещей. По результатам простых измерений этих частей тела у фиксированных в формалине особей были предложены несколько методик приблизительной оценки возраста голодающих особей (Pang et al., 1987; Yeh et al., 1995; Uspensky et al, 2006).

Для большей надежности результатов нами была предложена методика оценки возраста голодающих самок таежного клеща по видимым изменениям глубины краевой борозды и структуры поверхности кутикулы аллоскутума в процессе естественного старения. Этот метод позволяет визуально различать 2 группы живых клещей — недавно активизировавшихся и истощенных (Балашов и др., 2009).

Изменения внешнего облика голодающего клеща отражают динамику расходования пищевых резервов в его организме. Предполагают, что главным энергетически резервом голодающего клеща являются запасы жира (Steele, Randolph, 1985; Балашов, 1998). В организме напитавшихся особей происходят активные метаболические процессы, приводящие в результате переваривания крови прокормителя к депонированию запасных питательных веществ в виде жиров в клетках жирового тела и кишки (Григорьева, 2009). Трахейные стволы, окруженные тяжами жировых клеток и занимающие пространство между внутренними органами клеща, представляют наиболее доступную и наглядную для исследования часть жирового тела, которую иногда называют «трахейным комплексом». Основную массу жирового тела составляют клетки, в которые откладываются резервные вещества, главным образом жир. Немногочисленные клетки второго типа, нефроциты, осуществляющие эндоцитоз, принято относить наряду с мальпигиевыми сосудами к экскреторному аппарату (Балашов, 1998). Кроме того, исключительной особенностью иксодин является депонирование жировых резервов в кишечных клетках.

Качественная оценка содержания жира в жировом теле и кишечнике может указывать на степень старения особи и соответственно на ее биологический возраст. Эти предположения были подтверждены на динамике жировых резервов у голодных нимф из природных популяций клеща *Ixodes ricinus* в Англии (Steele, Randolph, 1985; Walker, 2001). Было исследовано содержание лииидов в кишке, мальпигиевых сосудах и слюнных железах европейского лесного клеща после фиксации отпрепарированных тканей в формалине и окрашивания их в судане III. Содержание жиров во внутренних органах соответствовало предполагаемому календарному возрасту нимф.

Рассмотренные исследования показывают исключительное значение жировых резервов для выживания голодающих клещей и возможность их использования как одного из критериев биологического возраста. В настоящей публикации нами сделана попытка оценки биологического возраста голодных особей таежного клеща по содержанию жиров в отпрепарированных внутренних органах и сделать его доступным для практического использования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В 2009 г. за сезон активности имаго таежного клеща с середины апреля по середину июня было вскрыто и обследовано на жировые запасы в кишечнике и жировом теле — трахейном комплексе 111 самок из ближайших пригородов и лесопарков Санкт-Петербурга. Отловленных самок до момента вскрытия, через 2—4 дня, содержали в эксикаторе с пересыщенным раствором сульфата натрия, обеспечивающим 96—98 % влажности при 5—8 °С. Самок вскрывали в фосфатном буфере pH 7.2. Кусочки жирового тела и кишки отпрепарировали и после промывания в 50°-ном спирте окрашивали в насыщенном растворе судана III в 70°-ном спирте в течение 20—30 мин. После промывки в 50°-ном спирте объекты заключали в глицерин. Просмотр этих препаратов в бинокулярном микроскопе при увеличениях 20—40 позволяет выявлять четкие ярко-красные капли жира (жировые включения диаметром 11—100 мкм) в клетках кишечника и жирового тела. Препараты сохраняются в течение 2—3 недель.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованных клещей можно разделить на 3 группы (табл. 1):

I — молодые, недавно выплодившиеся самки. Гладкая ровная, без вмятин поверхность скутума и выпуклая гладкая поверхность аллоскутума с ровной, равномерной бороздой позволяют предполагать, что особь молодая. Кутикула слабопрозрачная, ровного яркого цвета. Находящиеся под ней петли кишки почти полностью скрывают обильное жировое тело, оплетающее трахейный комплекс (рис. 1, см. вкл.). При вскрытии видно, что петли кишки толстые, ровные, однотонные. Молодые, недавно выплодившиеся самки имеют большие жировые запасы в кишечнике и в жировом теле (рис. 2, см. вкл.). Окрашенные суданом органы выглядят единой красной структурой, только по периферии которой можно разглядеть жир в виде отдельных капель. От общего числа исследованных эти самки составили 16 %, причем отмечали их только в конце апреля, в период наибольшей активности имаго.

II — зрелые самки. Поверхность кутикулы в основном теряет блеск, обнаруживаются отдельные потертости и вмятины, выпуклость аллоскутума уменьшается. Увеличивается прозрачность кутикулы, через нее четче виден кишечник и элементы трахейного комплекса (рис. 1). Общий объем жирового тела по отношению к трахейному комплексу уменьшается. Кишечные петли местами истончаются и приобретают неравномерную окраску. У зрелых самок жировые запасы уже частично ранее расходовались (рис. 3, см. вкл.).

Жировое тело и кишечник содержат жир в виде равномерно распределенных, отдельных, хорошо различимых капель. Таких самок регистрировали с апреля по июнь, их доля составила 21.3 %, причем 3/4 из них были выявлены во вторую половину апреля, а оставшаяся 1/4 часть равномерно распределилась на май и июнь.

III — старые самки. Такие самки имеют сильно потертую с вмятинами поверхность куликулы с дорсальной стороны. Глубокая неравномерная, *К ст. Ю. С. Балашова, Л. А. Григорьевой, с. 292.*

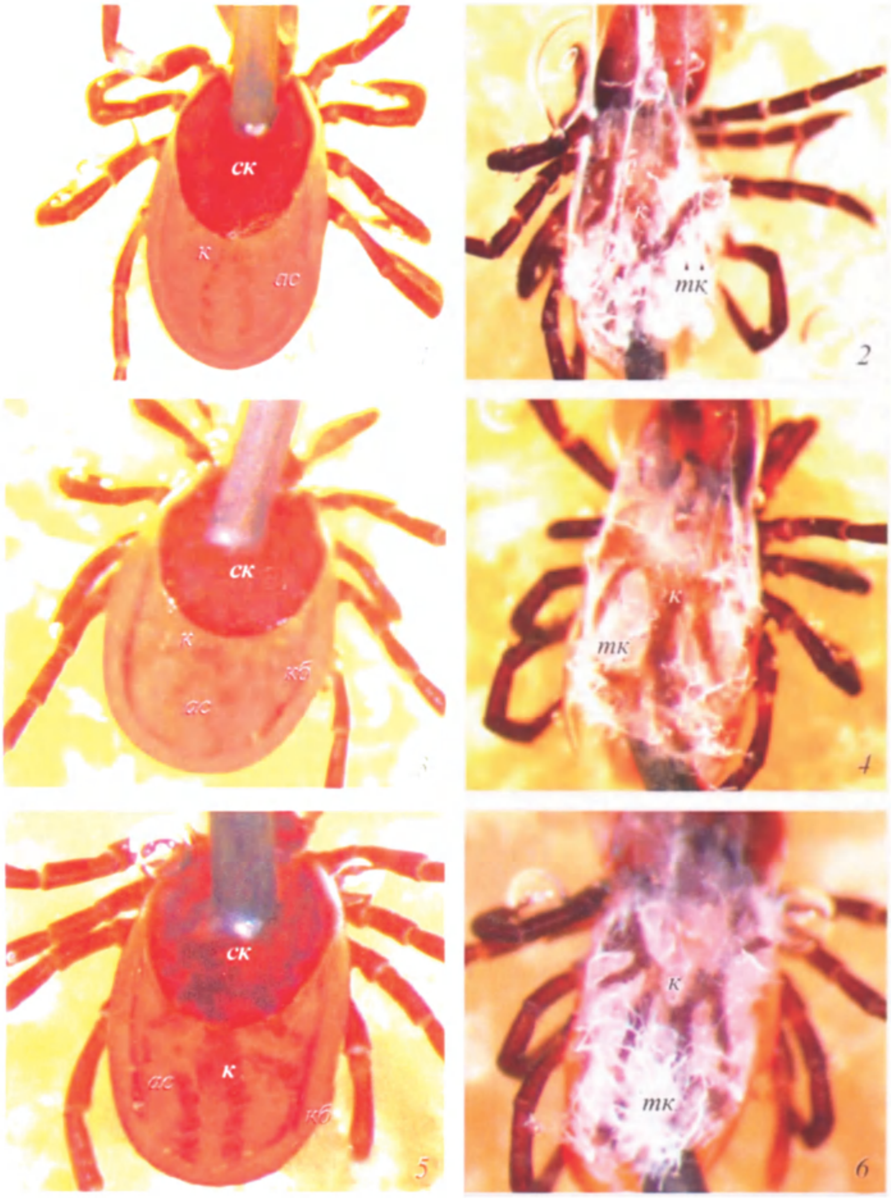

Рис. 1. Общий вид и вид вскрытой молодой (*1*, *2*), зрелой (*3*, *4*) и старой (*5*, *6*) самки таежного клеща.

ас — аллоскутум, *к* — петли кишечника, *ко* — краевая борозда, *ск* — скутум, *тк* — трахейный комплекс.

Fig. 1. Habit view and views of dissected young (*1*, *2*), mature (*3*, *4*), and old (*5*, *6*) females of the taiga tick.

К с. 292.

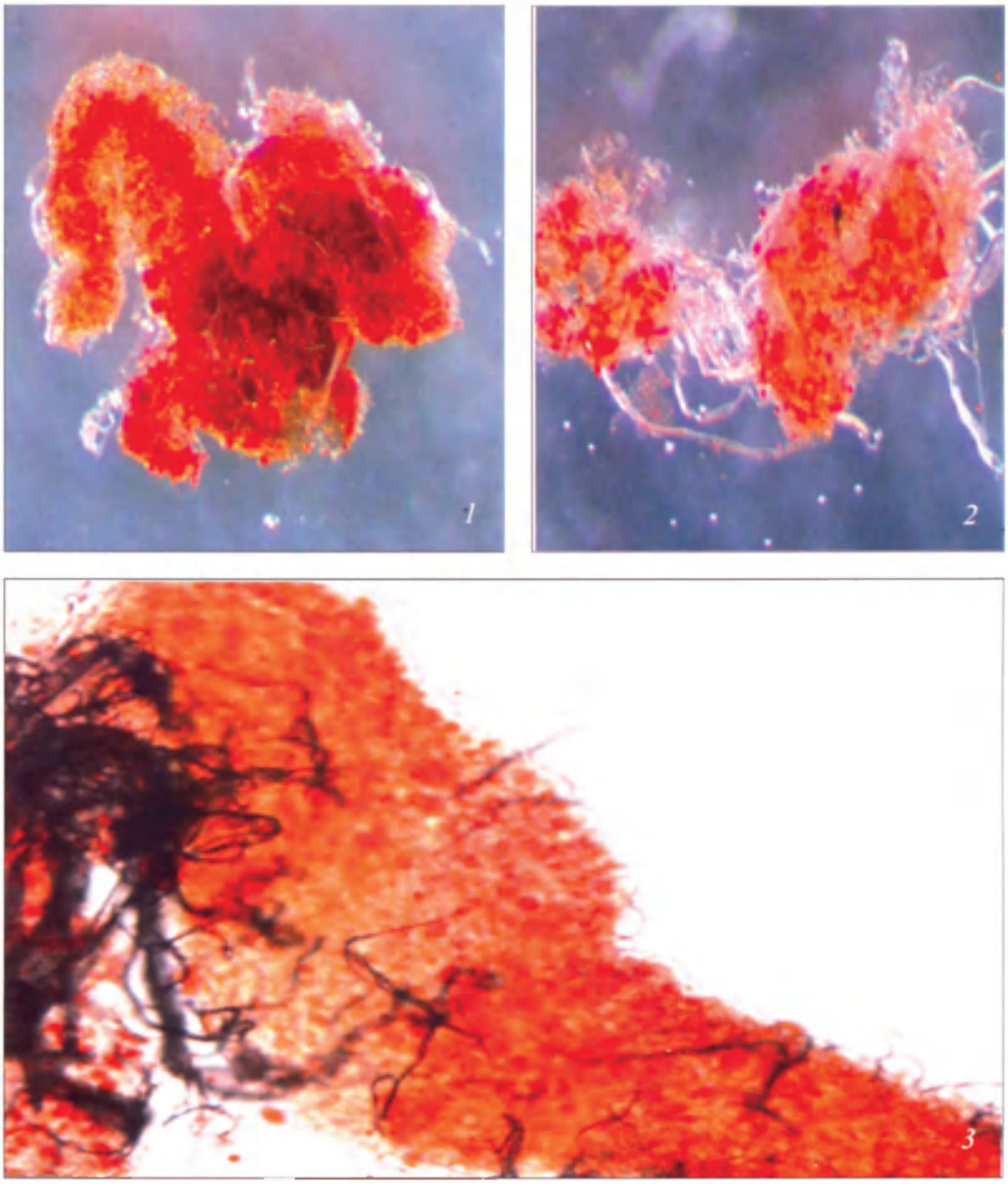

Рис. 2. Тотальный препарат кишечника (*1* — ×40; *3* — ×200) и жирового тела (*2* — ×40) молодой самки таежного клеща (судан III).

Жир в виде красных капель.

Fig. 2. Whole mount of the midgut (*1* — ×40; *3* — ×200) and fat body (*2* — ×40) of a young taiga tick female (Sudan III).

К с. 292.

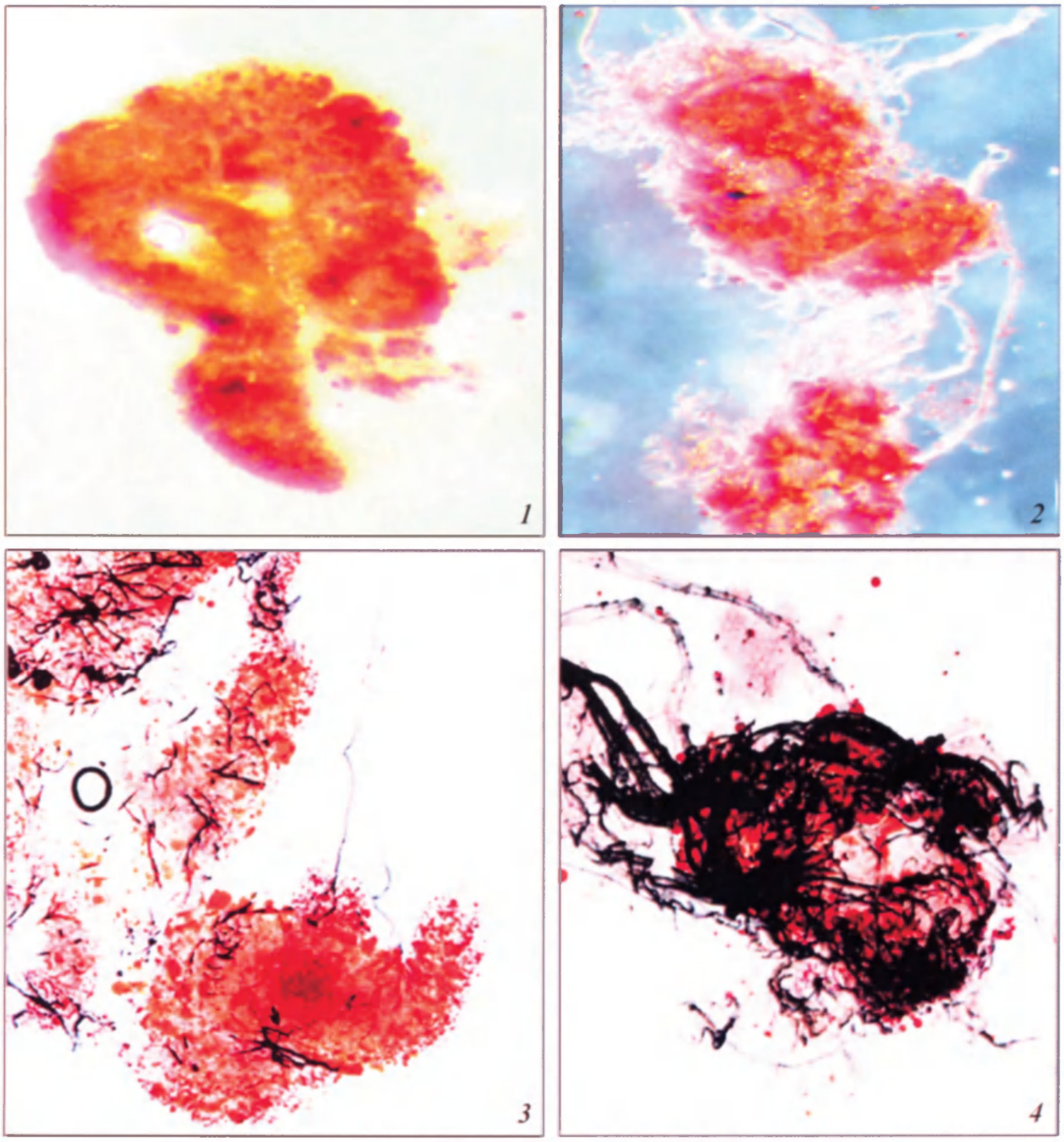

Рис. 3. Тотальный препарат кишечника (*1* — ×40; *3* — ×200) и жирового тела (*2* — ×40; *4* — ×200) зрелой самки таежного клеща (судан III).

Обозначения те же, что и на рис. 2.

Fig. 3. Whole mount of the midgut (*1* — ×40; *3* — ×200) and fat body (*2* — ×40; *4* — ×200) of a mature taiga tick female (Sudan III).

Таблица 1

Определение биологического возраста самок таежного клеща по состоянию пищевых резервов в организме

Table 1. Evaluation of the biological age of the taiga tick females basing on the state of food supply in their bodaies

Возрастные группы	По: Балашов, 1967	По: Балашов, Григорьева, 2010
I новорожденные	Недавно перелинявшие особи на стадии послелиночного доразвития. Отростки кишечника растянуты, полость кишки занята гипертрофироваными пищеварительными клетками, содержащими многочисленные включения гемоглобина и кристаллы гематина. Мальпигиевы сосуды прозрачные, содержат крупные и средних размеров сфериты гуанина.	
II молодые	Особи, недавно закончившие послелиночное доразвитие. Отростки кишечника не имеют перетяжек, внутри них — просвет. Пищеварительные клетки уменьшены в размерах, в дистальной части содержат многочисленные включения гемоглобина. Мальпигиевы сосуды прозрачные, содержат крупные и средних размеров сфериты гуанина.	Молодые, недавно выплодившиеся самки. Гладкая ровная, без вмятин поверхность скутума и выпуклая гладкая поверхность аллоскутума с ровной, равномерной бороздой. Кутикула слабопрозрачная, ровного яркого цвета, находящиеся под ней петли кишки почти полностью скрывают обильное жировое тело, оплетающее трахейный комплекс. При вскрытии видно, что петли кишки толстые, ровные, однотонные. Самки имеют большие жировые запасы в кишечнике и в жировом теле. Окрашенные суданом органы выглядят единой красной структурой, только по периферии которой можно разглядеть жир в виде отдельных капель (рис. 1, 2).
III зрелые	Клещи, находившиеся продолжительное время в состоянии активности. Отростки кишечника имеют многочисленные перетяжки, их диаметр уменьшился, имеют просвет. Пищеварительные клетки содержат незначительное количество гемоглобина или он отсутствует. Количество гематина в клетках увеличивается. Мальпигиевы сосуды становятся четковидными, их отдельные участки заполнены конкрециями гуанина.	Зрелые самки. Поверхность кутикулы в основном теряет блеск, обнаруживаются отдельные потертости и вмятины, выпуклость аллоскутума уменьшается. Увеличивается прозрачность кутикулы, через нее четче виден кишечник и элементы трахейного комплекса. Общий объем жирового тела по отношению к трахейному комплексу уменьшается. Кишечные петли местами истончаются и приобретают неравномерную окраску. Жировые запасы частично израсходова-

Таблица 1 (*продолжение*)

Возрастные группы	По: Балашов, 1967	По: Балашов, Григорьева, 2010
		ны. Жировое тело и кишечник содержат жир в виде равномерно распределенных, отдельных, хорошо различимых капель (рис. 1, 3)
IV старые	Длительно голодавшие сильно истощенные особи. Отростки кишечника сильно истончены, имеют многочисленные перетяжки. Стенки их местами спадаются, просвет исчезает. В пищеварительных клетках отсутствует гемоглобин, кристаллы гематина образуют значительные скопления. Мальпигиевы сосуды на всем протяжении растянуты гуанином.	Старые самки с сильно потертой и покрытой вмятинами поверхностью кутикулы аллоскутума. Глубокая неравномерная, частично загрязненная борозда — по краям аллоскутума. Кутикула приобретает стекловидную прозрачность, она легко рвется при вскрытии. Сквозь кутикулу хорошо виден кишечник и многочисленные трахеи. Петли кишечника истончены с перехватами. На трахейном комплексе среди рыхлой соединительной ткани клетки жирового тела отсутствуют. В клетках кишечника и жирового тела сохраняются лишь единичные жировые капли (рис. 1, 4).

частично загрязненная борозда — по краям аллоскутума. Кутикула приобретает стекловидную прозрачность, она легко рвется при вскрытии. Через кутикулу хорошо виден кишечник и многочисленные трахеи (рис. 1). Петли кишечника истончены с перехватами. На трахейном комплексе среди рыхлой соединительной ткани клетки жирового тела не идентифицируют-

Таблица 2

Возрастные группы самок таежного клеща с разными уровнями жировых запасов в природных популяциях в окрестностях Санкт-Петербурга

Table 2. Age groups of the taiga tick females with different levels of fat reserves in the natural populations from the suburbs of St. Petersburg

	Возрастные группы	Апрель (с 15 апреля)	Май	Июнь
Количество собранных самок, особи	I	18	0	0
	II	17	3	3
	III	12	36	22
Общее количество особей, %		18 (16 %)	23 (21.3 %)	70 (62.7 %)
Распределение самок из каждой группы по сезону активности, %	I	100	0	0
	II	75	12.5	12.5
	III	17	51	32
Распределение самок из каждой группы по месяцам, %	I	38.3	0	0
	II	36.2	7.7	12
	III	25.5	92.3	88

ся. У старых самок ограниченные запасы жира, в кишечнике и жировом теле отмечали лишь единичные жировые капли (рис. 4, см. вкл.). Эти самки составляют большинство популяции: 62.7 % в период активности имаго. В выборке конца апреля они составили 17 %. В майских сборах их доля увеличилась до 51 %, в июне их количество остается значительным — 32 %. От общей численности популяции на их долю приходится 85 %.

По результатам вскрытий клещей, собранных в окрестностях Санкт-Петербурга, в апреле молодые недавно выплодившиеся самки (группа I) составляют 38.3 % (табл. 2). Самки, частично израсходовавшие жировые ресурсы, представлены в сборах на 36.2 %, на долю старых истощенных самок приходится 25.5 %. В последующие месяцы очевидно старение популяции за счет значительного увеличения самок 3-й группы до 88 и 92.3 %.

Сравнивая принятую систему определения биологического возраста с нашей остается отметить, что она дополняет традиционную и предлагает использовать определение количества жира в кишечнике и жировом теле в качестве универсального естественного «маркера» возраста клещей. Отсутствие в нашей схеме клещей 1-й группы объясняется тем, что мы брали материал из природы, где вновь выплодившихся клещей отловить практически невозможно, так как они еще не активны. Однако исследование и описание подобного материала из культуры клещей вполне возможно.

Следует отметить, что расходование жира из жирового тела и кишечника происходит не синхронно. По нашим данным, в организме голодающей самки быстрее используется жир жирового тела, в кишечнике жир сохраняется дольше. Поэтому судить о состоянии энергетических резервов и о возрасте следует, полагаясь на исследование обоих органов.

В результате проделанной работы было установлено, что одним из критериев оценки биологического возраста голодных клещей из природных популяций может быть количество жира в организме. Разработанная нами методика позволяет путем вскрытий живых клещей определять биологический возраст самок по содержанию жировых запасов в клетках стенок кишечника и жирового тела. В результате по состоянию запасов жиров удалось выделить 3 возрастные группы, отличающиеся по срокам их жизни после линьки из напитавшихся нимф.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 08-04-00148а).

Список литературы

Балашов Ю. С. 1961. Динамика запасных питательных веществ и определение возраста у голодных иксодовых клещей. Зоол. журн. 40: 1354—1363.

Балашов Ю. С. 1962. Определение физиологического возраста и возрастной состав голодных самок *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus* в Ленинградской области. Мед. паразитол. 1: 47 55.

Балашов Ю. С. 1998. Иксодовые клещи — паразиты и переносчики инфекций. СПб.: Наука. 287 с.

Балашов Ю. С. 2009. Паразитизм клещей и насекомых на наземных позвоночных. СПб.: Наука. 357 с.

К с. 295.

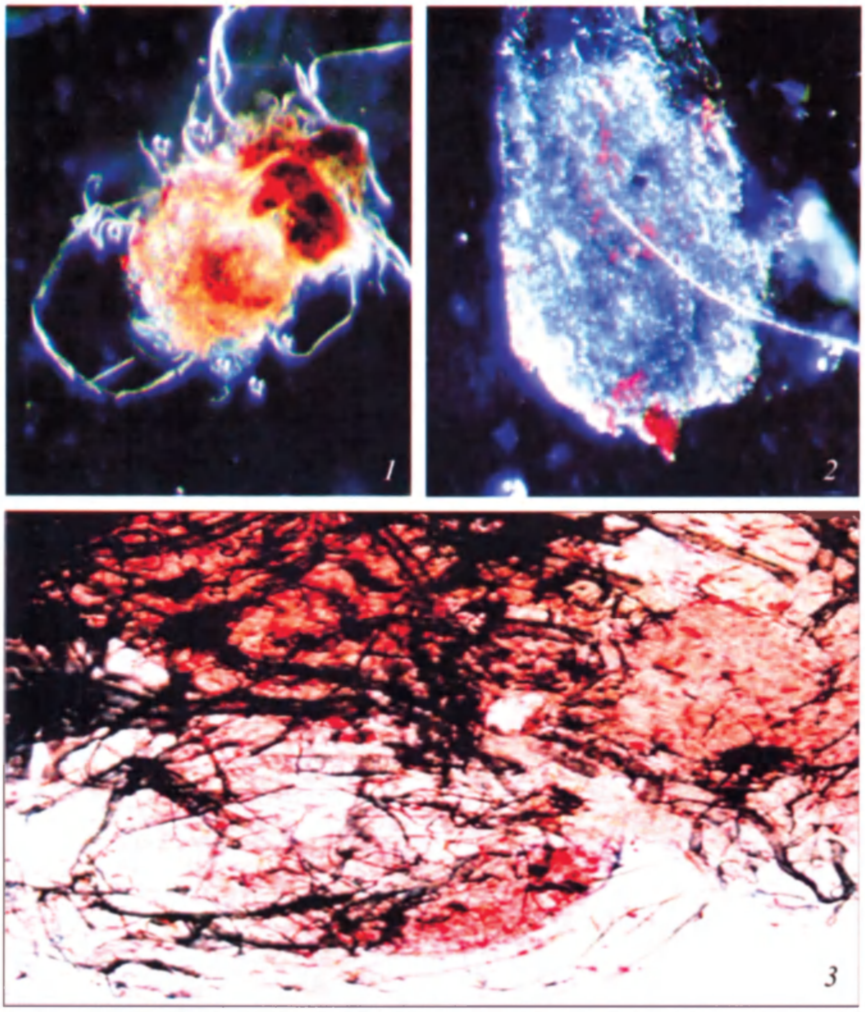

Рис. 4. Тотальный препарат кишечника (*1* — ×40; *3* — ×200) и жирового тела (*2* — ×40; *3* — ×200) старой самки таежного клеща (судан III).

Обозначения те же, что и на рис. 2.

Fig. 4. Whole mount of the midgut (*1* — ×40; *3* — ×200) and fat body (*2* — ×40; *3* — ×200) of an old taiga tick female (Sudan III).

Балашов Ю. С. 2010. Значение популяционной структуры иксодовых клещей (Ixodidae) для поддержания природных очагов инфекций. Зоол. журн. 89: 18—25.

Балашов Ю. С., Григорьева Л. А., Леонович С. А. 2009. Определение биологического возраста самок таежных клещей (Ixodes persulcatus) по изменениям формы тела и поверхности кутикулы. Паразитология. 43: 433—436.

Григорьева Л. А. 2009. Морфофункциональные изменения кишечника клещей иксодин (Acari: Ixodidae) на протяжении жизненного цикла. Паразитология. 43: 411—417.

Разумова И. В. 1977. Физиологический возраст имаго иксодовых клещей и ускоренный метод его определения. Мед. паразитол. 5: 557—566.

Разумова И. В. 1982. Усовершенствованный метод гистологического определения физиологического возраста иксодовых клещей (Ixodidae). Паразитология. 16: 209—218.

Разумова И. В. 1987. Аналитический экспресс-метод определения физиологического возраста клещей рода Ixodes. Мед. паразитол. 6: 33—38.

Репкина Л. В. 1985. Физиологический возраст. В кн.: Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae): Морфология, систематика, экология, медицинское значение / Ред. Н. А. Филиппова. Л. С. 232—238.

Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae): Морфология, систематика, экология, медицинское значение / Ред. Н. А. Филиппова. 1985. Л. 416 с.

Pang C. J., He H., Chen G. S. 1987. Observation on phisiological age of Dermacentor nuttalli in Altai District. Acta Entomol. Sin. 30 (1): 55—60.

Randolph S. E. 2004. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid tick vectors. Parasitology. 129: 37—65.

Steele G. M., Randojph S. E. 1985. An experimental evaluation of conventional control measures against the sheep tick *Ixodes ricinus*. I. A unimodal seasonal activity pattern. Bull. Entomol. Res. 75: 489—499.

Uspensky I. 1995. Physiological age of ixodid ticks: aspects of its determination and application. Journ. Med. Entomol. 32: 751—764.

Uspensky I., Kovalevskii Y. V., Korenberg E. I. 2006. Physiological age of field-collected female taiga ticks, *Ixodes persulcatus* (Acari: Ixodidae), and their infection with Borrelia burgdorferi sensu lato. Exper. Appl. Acarol. 38: 201—209.

Walker A. R. 2001. Age structure of a population of Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in relation to its seasonal questing. Bull. Entomol. Res. 91: 69—78.

Yeh M.-T., Back J. M., Hu R., Nicholson M. C., Kelly C., Mather T. N. 1995. Determining the duration of Ixodes scapularis attachment to tick-bite victims. Journ. Entomol. 32: 853—858.

ESTIMATION OF THE BIOLOGICAL AGE IN TAIGA TICK FEMALES (IXODES PERSULCATUS: IXODIDAE) BY THE FAT RESERVES IN ORGANISM

Yu. S. Balashov, L. A. Grigoryeva

Key words: *Ixodes persulcatus*, females, biological age, fat reserves, midgut, fat body.

SUMMARY

The method of estimation of the biological age in non-feeding tick females by the level of adipose inclusions in the cells of the midgut and fat body is developed. In order to estimate the fat reserves in non-feeding females, alive ticks were dissected and fragments of their internal were vitally stained with the pregnant solution of sudan III in 70 % ethanol. Three age-specific groups were established: I, young females whose intestines and fat body were filled with fat in clusions; II, mature females whose fat reserves were partially expended; III, old females having isolated fat inclusions in their midgut and fat body.